

# Produção de biossurfactantes: manoproteínas intracelulares e sofrorolipídios extracelulares por *Saccharomyces cerevisiae*

*Biosurfactant production: intracellular manoproteins and extracellular sophorolipids by *Saccharomyces cerevisiae**

Naiara Elisa Kreling<sup>1</sup> , Munise Zaparoli<sup>1</sup> , Ana Cláudia Margarites<sup>1</sup> , Davila Zampieri<sup>2</sup> , Luciane Maria Colla<sup>1\*</sup> 

## RESUMO

Os biossurfactantes apresentam inúmeras aplicações ambientais e são produzidos por diversos microrganismos. Os provenientes da levedura *Saccharomyces cerevisiae* são pouco estudados para fins ambientais, sendo atóxicos. Objetivou-se o estudo da produção de biossurfactantes intra e extracelular por essa levedura, desenvolvida em meio de cultivo contendo 0,5% de extrato de levedura e 1% de peptona, além de concentrações variadas de sacarose e indutores oleosos — glicerol e óleos de soja e diesel. Os experimentos foram realizados durante 96 horas, e a produção de biossurfactantes foi avaliada diariamente, por meio da redução da tensão superficial e de estabilização de emulsões. O biossurfactante extracelular foi extraído da biomassa obtida, com posterior precipitação e caracterização química por intermédio de espectrometria de massa. As maiores produtividades de emulsificantes extracelulares foram obtidas com glicerol (0,20 UE.h<sup>-1</sup>) e óleo de soja (0,21 UE.h<sup>-1</sup>), em 48 horas de cultivo. Em ensaios posteriores, realizados com aumento da concentração de indutor, foi verificado um aumento das produtividades extracelulares para 0,45 UE.h<sup>-1</sup> para o glicerol e 0,30 UE.h<sup>-1</sup> para o óleo de soja. A maior redução da tensão superficial foi de 989%, em 72 horas, para o indutor óleo diesel. A diminuição dessa tensão, aliada ao aumento das atividades emulsificantes, é um importante indicativo da utilização do substrato hidrofóbico pelo microrganismo. O estudo comprova aumento na produção de biossurfactantes extracelulares quando realizada otimização de cultivo. Para a produção dos intracelulares, a necessidade de processo de rompimento celular aumenta os custos do bioprocessamento.

**Palavras-chave:** bioprocessamento; tensão superficial; atividade emulsificante; aplicação ambiental.

## ABSTRACT

Biosurfactants implicate many environmental applications, being produced by a wide range of microorganisms. Those from the *Saccharomyces cerevisiae* yeast are still poorly studied for environmental purposes and are non-toxic. The aim of the study was the production of intra- and extracellular biosurfactants by the *Saccharomyces cerevisiae* yeast. The yeast was grown in cultured medium containing 0.5% yeast extract, 1% peptone and variable concentrations of sucrose and oily inducers. Inducers used were glycerol, soybean oil and diesel oil. Experiments were conducted for 96 h, and the daily production of biosurfactants was evaluated by reducing surface tension and stabilizing emulsions. Extracellular biosurfactant was extracted from the obtained biomass, with subsequent precipitation and chemical characterization by mass spectrometry. The highest extracellular emulsifier yields were achieved with glycerol inductor (0.20 UE h<sup>-1</sup>) and soybean oil (0.21 UE h<sup>-1</sup>) in 48h of cultivation. In later tests performed with increasing concentration of inducer, an increase in extracellular yields was noticed in these experiments (0.45 UE h<sup>-1</sup> for glycerol and 0.30 UE h<sup>-1</sup> for the soybean oil). The greatest reduction in surface tension was 989% in 72 h for diesel oil inducer. The reduction of surface tension combines with the increase of emulsifying activities in an important indicator of the use of hydrophobic substrate by the microorganism. The study confirms an increase in the production of extracellular biosurfactants when optimizing cultivation. The production of intracellular biosurfactants has also been verified, however the process of cellular disruption increases the cost of the bioprocess.

**Keywords:** bioprocess; surface tension; emulsifying activity; environmental application.

## INTRODUÇÃO

Os biossurfactantes são compostos de origem microbiana obtidos por bioprocessos que apresentam como principal característica serem

moléculas constituídas de uma porção hidrofílica e uma hidrofóbica, com propriedades emulsificantes e de redução da tensão superficial (DESAI; BANAT, 1997; SATPUTE *et al.*, 2010).

<sup>1</sup>Universidade de Passo Fundo - Passo Fundo (RS), Brasil.

<sup>2</sup>Universidade Federal do Ceará - Fortaleza (CE), Brasil.

\*Autor correspondente: lmcolla2@gmail.com

Recebido: 16/08/2016 - Aceito: 17/09/2018 - Reg. ABES: 167957

Essas características físico-químicas tornam esses compostos úteis no setor ambiental, em aplicações como a biorremediação de resíduos oleosos em solos ou águas, na limpeza de tanques e na recuperação de derivados do petróleo (DECESARO *et al.*, 2015; JAIN *et al.*, 2013; LIU *et al.*, 2008; PACWA-PLOCINICZAK *et al.*, 2011). A característica de reduzirem as tensões superficial e interfacial contribui para o aumento da solubilidade e área de contato de compostos insolúveis, ocasionando a biodisponibilidade do contaminante e a maior possibilidade de biodegradação (BEZZA; CHIRWA, 2015).

Aplicações desses biocompostos também foram descritas na área alimentícia, para aumento da consistência de alimentos (BARROS *et al.*, 2007; FAI *et al.*, 2015), e na indústria farmacêutica, como inibidores da adesão de organismos patogênicos em superfícies (GHARAEI-FATHABAD, 2011).

As vantagens do uso de biossurfactantes em relação aos surfactantes químicos são a sua biodegradabilidade, baixa toxicidade e possibilidade de uso de substratos renováveis e resíduos de processos de produção, o que agrega valor aos resíduos, diminui os custos de produção e contribui para a redução da poluição ambiental (FONTES; AMARAL; COELHO, 2008). Porém, os biossurfactantes ainda não são competitivos no mercado, em virtude principalmente dos custos de produção, sendo necessária otimização dos processos e meios de cultivos utilizados, bem como o uso de microrganismos de mais fácil cultivo (BANAT *et al.*, 2014).

A produção de desses biocompostos por leveduras, principalmente pelos gêneros *Candida* (ACCORSINI *et al.*, 2012; LUNA *et al.*, 2015; SANTOS *et al.*, 2014) e *Yarrowia* (MORAIS; ABUD, 2012), é bem documentada, entretanto poucos relatos existem da possibilidade de produção de biossurfactantes extracelulares a partir da levedura *Saccharomyces cerevisiae* (ALCANTARA *et al.*, 2012; ILORI; AMOBI; ODOCHA, 2005).

A produção de manoproteínas, que são biossurfactantes intracelulares componentes das paredes celulares de *S. cerevisiae*, é mais bem documentada (MELO *et al.*, 2015; WU; GUAN; ZHONG, 2015). No entanto, sabe-se que os biocompostos intracelulares incluem custos no processo de extração superiores aos das operações de *downstream* de compostos extracelulares, por conta da necessidade do rompimento celular necessário para a posterior extração e purificação.

A *S. cerevisiae* é de fácil isolamento e cultivo, apresenta baixa toxicidade e alto poder de manipulação genética; é muito utilizada na produção de etanol e bebidas alcoólicas por meio de processos fermentativos (ARAUJO; FREIRE; NITSCHKE, 2013; VILELA; SGARBIERI; ALVIM, 2000), sendo um microrganismo que pode ser mais bem investigado em relação ao seu potencial para a obtenção de biossurfactantes intra e extracelulares, que foi o intuito deste trabalho. Objetivou-se ainda avaliar a influência das fontes de carbono açucaradas e oleosas na liberação de biossurfactantes extracelulares por essa levedura.

## METODOLOGIA

### Microrganismo, meio de cultivo e delimitação experimental

O microrganismo utilizado foi a levedura *Saccharomyces cerevisiae* liofilizada, obtida comercialmente na forma de fermento para produção de pães da marca Saf-Instant®.

O meio de cultivo foi preparado utilizando-se 0,5% (p.v<sup>-1</sup>) de extrato de levedura, 1% de peptona (m.v<sup>-1</sup>) e sacarose segundo delineamento experimental (Tabela 1). O pH foi ajustado entre 6,0 e 6,5 com a adição de hidróxido de sódio 1 mol.L<sup>-1</sup> ou de ácido clorídrico 0,1 mol.L<sup>-1</sup>. O meio foi esterilizado em autoclave por 21 minutos a 121°C. A fim de estimular a produção de biossurfactantes extracelulares, foram adicionados indutores oleosos (óleo de soja, óleo diesel e glicerol) aos meios de cultivo. Um delineamento experimental avaliando a influência das concentrações de sacarose e indutor foi realizado para cada tipo de indutor em estudo (Tabela 1).

Os experimentos foram realizados em frascos do tipo erlenmeyer de 250 mL, contendo 100 mL de meio inicial. Os meios foram inoculados com 1% (m.v<sup>-1</sup>) de levedura liofilizada, e os cultivos foram realizados por 96 horas a 30°C sob agitação constante (100 rpm). Nos tempos amostrais (0 h, 24 h, 48 h, 72 h e 96 h), os inóculos foram submetidos à centrifugação a 5.000 rpm por 20 minutos, para separação das células. A biomassa foi utilizada para a determinação da produção de biossurfactantes intracelulares e o meio livre de células, para a avaliação da produção de biossurfactantes extracelulares.

**Tabela 1** - Delineamentos experimentais utilizados para a composição do meio de cultivo para a produção de biossurfactantes intra e extracelulares de *Saccharomyces cerevisiae*.

Primeiro delineamento experimental (2 <sup>2</sup> ) <sup>1</sup>		
Experimento	X <sub>1</sub> – Sacarose	X <sub>2</sub> – Indutor <sup>2</sup>
P1	10 g.L <sup>-1</sup> (-1)	10 g.L <sup>-1</sup> (-1)
P2	30 g.L <sup>-1</sup> (+1)	10 g.L <sup>-1</sup> (-1)
P3	10 g.L <sup>-1</sup> (-1)	20 g.L <sup>-1</sup> (+1)
P4	30 g.L <sup>-1</sup> (+1)	20 g.L <sup>-1</sup> (+1)
Segundo delineamento experimental <sup>3</sup>		
Experimento	X <sub>1</sub> – Sacarose	X <sub>2</sub> – Indutor <sup>2</sup>
S1	2 g.L <sup>-1</sup> (-1)	15 g.L <sup>-1</sup> (-1)
S2	10 g.L <sup>-1</sup> (+1)	15 g.L <sup>-1</sup> (-1)
S3	2 g.L <sup>-1</sup> (-1)	45 g.L <sup>-1</sup> (+1)
S4	10 g.L <sup>-1</sup> (+1)	45 g.L <sup>-1</sup> (+1)
S5	6 g.L <sup>-1</sup> (0)	30 g.L <sup>-1</sup> (0)
S6	6 g.L <sup>-1</sup> (0)	30 g.L <sup>-1</sup> (0)
S7	6 g.L <sup>-1</sup> (0)	30 g.L <sup>-1</sup> (0)

<sup>1</sup>Os experimentos foram realizados em duplicata; <sup>2</sup>foi utilizado um delineamento experimental para cada indutor (óleo diesel, óleo de soja e glicerol); <sup>3</sup>os experimentos não foram realizados em duplicata devido à inserção dos pontos centrais para o cálculo do erro padrão.

Um segundo delineamento experimental (Tabela 1) foi realizado após a obtenção dos resultados do primeiro. As condições de preparo do meio de cultivo foram mantidas, alterando-se somente as concentrações de sacarose e indutor. Os experimentos foram avaliados por um período de 72 horas, e amostras foram retiradas nos tempos 0, 24 e 72 horas, para verificar somente a produção de biossurfactantes extracelulares.

## Determinações analíticas

### Extração dos biossurfactantes intracelulares

Os biossurfactantes intracelulares foram extraídos da biomassa centrifugada segundo metodologia proposta por Torabizadeh, Shojaosadati e Tehrani (1996), tendo sido realizada a substituição do citrato de potássio pelo de sódio, na mesma concentração molar. A biomassa obtida em cada ensaio foi suspensa em 10 mL de solução de citrato de sódio 0,1 mol.L<sup>-1</sup> e metabissulfito de potássio 0,02 mol.L<sup>-1</sup>, com pH ajustado em 7, seguido de autoclavagem por 2 horas a 121°C e posterior centrifugação a 5.000 rpm por 10 minutos. A 5 mL do sobrenadante obtido, adicionaram-se 15 mL de etanol 95%, contendo 1% de ácido acético (v.v<sup>-1</sup>), os quais foram refrigerados por 16 horas a 4°C. Depois, a amostra foi novamente centrifugada a 5.000 rpm por 10 minutos. O precipitado foi recolhido e diluído 100 vezes em água destilada (mantendo a mesma relação de volume de meio no início do processo fermentativo), e esse extrato contendo o biossurfactante intracelular purificado foi utilizado nas determinações de atividade emulsificante óleo em água e água em óleo.

### Determinação de atividade emulsificante

A partir dos extratos livres de células e daqueles contendo os biossurfactantes intracelulares, foram realizadas as determinações das atividades emulsificantes óleo em água (O/A) e água em óleo (A/O), segundo método proposto por Martins *et al.* (2006) que consiste na mistura de 3,5 mL de extrato contendo o biossurfactante e 2 mL de óleo de milho seguido de agitação em vórtex a 700 rpm por 1 minuto. Após 60 minutos de repouso, foi determinada a absorvância da fase inferior formada no tubo de ensaio em espectrofotômetro a 610 nm, sendo essa leitura utilizada para o cálculo da atividade emulsificante O/A, conforme Equação 1. Após 24 horas de repouso, mediu-se a altura da emulsão A/O formada (fase superior) e a altura total de líquido no tubo. A atividade emulsificante A/O é calculada segundo as Equações 2 e 3. Os brancos foram calculados utilizando-se óleo de milho e água.

$$AE_{O/A} = (ABS_{amostra} - ABS_{branco}) \quad (1)$$

$$E = \frac{h_{emulsão}}{h_{total}} * 100 \quad (2)$$

$$AE_{A/O} = (E_{amostra} - E_{branco}) \quad (3)$$

Em que:

AE = atividade emulsificante (UE);

O/A = óleo em água;

A/O = água em óleo;

ABS = absorvância;

E = relação centesimal entre a altura da emulsão A/O e a altura total (mm).

Com os resultados obtidos das atividades emulsificantes O/A e A/O, foi possível calcular as produtividades das emulsões durante o tempo de fermentação, de acordo com a Equação 4.

$$P_{AE} = \frac{Atividade_{final} - Atividade_{inicial}}{Tempo} \quad (4)$$

Em que:

P<sub>AE</sub> = produtividade de atividade emulsificante (UE.h<sup>-1</sup>);

Atividade<sub>final</sub> = atividade emulsificante no tempo final (UE);

Atividade<sub>inicial</sub> = atividade emulsificante no tempo inicial (UE);

Tempo (h).

### Tensão superficial

A tensão superficial foi determinada no meio livre de células, de acordo com o método do anel (*Du-Nuoy's ring method*), com tensiômetro da marca Biolin Scientific, modelo Sigma 702. O percentual de redução da tensão superficial em relação à do início do processo fermentativo foi calculado pela Equação 5.

$$RTS = \frac{TS_{inicial} - TS_{final}}{TS_{inicial}} * 100 \quad (5)$$

Em que:

RTS = redução da tensão superficial (%);

TS<sub>inicial</sub> = tensão superficial dos meios no início do processo fermentativo (mN.m<sup>-1</sup>);

TS<sub>final</sub> = tensão superficial dos meios no fim do processo fermentativo (mN.m<sup>-1</sup>).

### Identificação dos biossurfactantes extracelulares

Os biossurfactantes extracelulares produzidos foram precipitados conforme método proposto por Illori, Adebusoye e Ojo (2008) e liofilizados (liofilizador da marca Terroni®, modelo LS 3000), sendo utilizados para a identificação por meio de espectrometria de massa. A amostra foi preparada dissolvendo 2 µg do biossurfactante em uma solução de metanol/água (1:1 v.v<sup>-1</sup>).

Para preparar a placa de *matrix-assisted laser desorption/ionization* (MALDI), 1 µL do biossurfactante foi colocado sobre uma placa de 384 local (aço inoxidável polido) e seco à temperatura ambiente. A amostra seca foi então coberta com 1 µL de uma solução de matriz 2,5 dihidroxibenzóico (DHB) (30 mg.mL<sup>-1</sup> em metanol). As análises foram

realizadas por *matrix-assisted laser desorption/ionization-massspectrometry* (MALDI-MS) em Bruker Autoflex III (Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha), operado em modo refletor e equipado com um laser de *smart beam* 337 nm. Cada espectro foi adquirido com 700 *laser shots* em um único disparo. A região de  $m.z^{-1}$  sobre a qual os íons foram detectados foi de 1.000 a 1.600  $m.z^{-1}$  no modo íon positivo. A faixa de potência do laser foi ajustada para 60%, e as medições foram realizadas nas seguintes condições: fonte de íons 1 = 19,0 kV; fonte de íons 2 = 16,6 kV; tensão da lente = 8,7 kV; tensão do refletor 1 = 21,0 kV; tensão do refletor 2 = 9,70 kV; *delay* de extração dos íons = 1,1 ns; supressão = 500 Da.

### Tratamento dos dados e análise estatística

Os resultados de produtividade de atividades emulsificantes foram avaliados de acordo com a metodologia de planejamento de experimentos, na qual se estimam os efeitos principais e de interação das variáveis avaliadas com o auxílio do *software* Statistica 7.0®.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Avaliação da produção de biossurfactantes intra e extracelulares a partir do primeiro delineamento experimental

Os resultados de produtividade de atividade emulsificante obtidos no primeiro delineamento experimental estão apresentados na Figura 1, na qual se verifica que a produção de biossurfactantes intracelulares foi superior à de biossurfactantes liberados para o meio de cultivo. Os biossurfactantes intracelulares são associados ao crescimento celular e já foram caracterizados como manoproteínas (BARRIGA *et al.*, 1999), sendo componentes de parede celular, e identificados como do tipo polimérico com capacidade de estabilizar emulsões de diferentes polaridades (COSTA; MAGNANI; CASTRO-GOMÉZ, 2012; DIKIT *et al.*, 2010). Os ensaios foram realizados em duplicata apenas para os biossurfactantes extracelulares.

As máximas produtividades de biossurfactantes intracelulares com atividade A/O foram obtidas no experimento 1 para o indutor glicerol (1,49 UE.h<sup>-1</sup>), em 3 e 4 (1,99 UE.h<sup>-1</sup> e 2,19 UE.h<sup>-1</sup>) para o diesel e no 4 (2,87 UE.h<sup>-1</sup>) quando utilizado o óleo de soja como indutor. Em relação às atividades emulsificantes O/A, para os biossurfactantes intracelulares, as maiores produtividades foram obtidas no experimento 2 (0,37 UE.h<sup>-1</sup>) para o indutor glicerol e no 4 (0,46 UE.h<sup>-1</sup>) para o óleo de soja. Os melhores resultados para as atividades A/O são relacionados à composição química desse tipo de emulsificante (polimérico), solúvel em água, que, por apresentar alto peso molecular, tem a sua agregação de micelas limitadas (CAMERON; COOPER; NEUFELD, 1988; CHAPRÃO, 2015). Para a produção de biossurfactantes intracelulares, o uso do indutor óleo de soja favoreceu o aumento da produtividade de

atividade emulsificante para formação de emulsões tanto A/O quanto O/A (2,87 UE.h<sup>-1</sup> e 0,46 UE.h<sup>-1</sup>, respectivamente).

Embora a Figura 1 mostre a maior eficiência do microrganismo para a produção de biossurfactantes intracelulares, por conta da desvantagem associada à produção industrial desses compostos, devido aos maiores custos de purificação geralmente associados (KATEMAI, 2011; SARI; KUSHARYOTO; ARTIKA, 2014), buscou-se implementar a obtenção de biossurfactantes extracelulares a partir da levedura *S. cerevisiae*. Dessa forma, os resultados de produção de biossurfactantes extracelulares foram analisados buscando-se modificar as condições de cultivo a fim de otimizar essa produção.

As máximas produtividades de biossurfactantes extracelulares foram todas obtidas nos experimentos 1 (concentração de sacarose e indutor de 10 g.L<sup>-1</sup>) dos delineamentos experimentais, em até 72 horas de cultivo, para os 3 indutores testados. As produtividades em A/O foram maiores em relação à O/A, e as máximas produções foram verificadas para os indutores glicerol (0,20 UE.h<sup>-1</sup>) e óleo de soja (0,21 UE.h<sup>-1</sup>). Não foram verificadas produções de emulsão O/A quando utilizado o indutor óleo diesel. Os efeitos estimados das variáveis sobre as produtividades estão apresentados na Tabela 2.

A interação dos efeitos da adição de sacarose e indutor sobre as produtividades de biossurfactantes extracelulares com capacidade de formação de emulsões do tipo A/O foi significativa ( $p < 0,05$ ) para todos os indutores testados, mostrando que as maiores produtividades foram obtidas nas menores concentrações de ambos.

Em relação à produção de biossurfactantes extracelulares com capacidade de formação de emulsões do tipo O/A, o crescimento de sacarose foi significativo e negativo quando usado o indutor óleo de soja ( $p = 0,001$ ). Já a concentração de indutor foi significativa e negativa para o glicerol ( $p = 0,010$ ). As interações entre as variáveis foram significativas apenas para o último, para o qual a maior produtividade de emulsões O/A é atingida com uma menor concentração de indutor.

Considerando que as máximas atividades emulsificantes foram alcançadas em até 72 horas para ambas as emulsões A/O e O/A e buscando a otimização da produção de biossurfactantes extracelulares, um novo delineamento foi elaborado. Por causa dos efeitos contraditórios da concentração de indutor sobre as produtividades de biossurfactantes com capacidade de emulsificação O/A e A/O, optou-se por aumentar as concentrações de indutores testados. Já a concentração de sacarose foi reduzida, conforme indicaram os efeitos dessa variável sobre a produtividade das emulsões. A opção de se aumentar a concentração dos indutores foi tomada a fim de estimular o uso de fontes lipídicas de carbono pela levedura. No metabolismo microbiano, sempre que uma fonte simples de carbono é adicionada, esta é usada primeiramente pelo microrganismo (MAKKAR; ROCKNE, 2003). Assim, a hipótese foi de que a redução da fonte simples de carbono (concentração de sacarose) pudesse estimular o uso das fontes lipídicas de carbono (glicerol, óleo

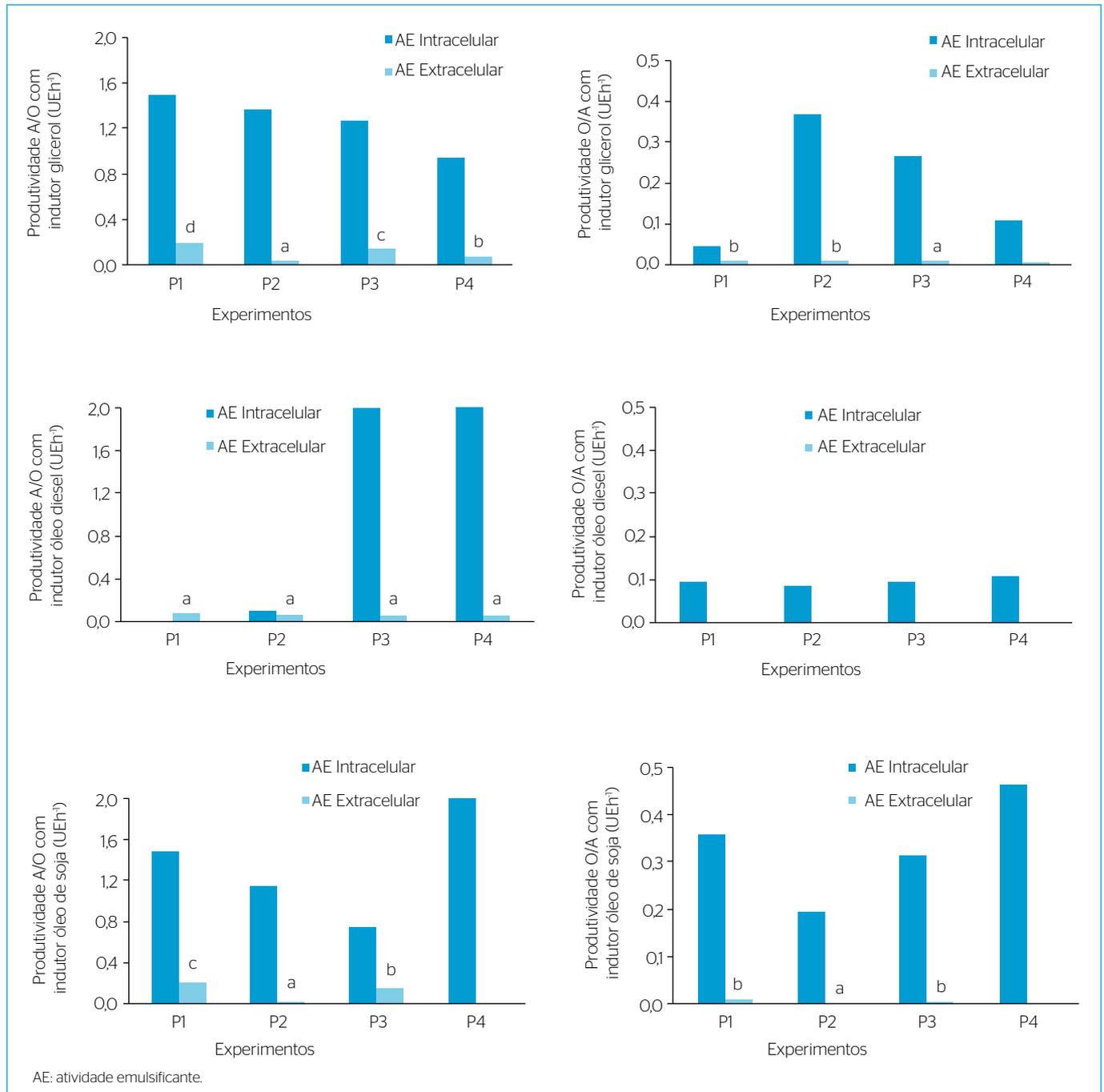
de soja ou óleo diesel), resultando em uma maior produção de biossurfactantes extracelulares, vista a necessidade do microrganismo de assimilação dessas fontes de carbono.

Decesaro *et al.* (2013) avaliaram a produção de biossurfactantes a partir de *Bacillus* e *Pseudomonas* e obtiveram produtividades entre 1,68 e 3,22 UE.h<sup>-1</sup> para atividades emulsificantes A/O e entre 0,03 e 0,04 UE.h<sup>-1</sup> para as O/A, quando adicionadas 10 g.L<sup>-1</sup> de óleo diesel como indutor. Em nosso estudo, a levedura *Saccharomyces cerevisiae* apresentou produtividades extracelulares maiores para

as atividades O/A, de 0,07 UE.h<sup>-1</sup>, para a mesma concentração de indutor adicionado.

### Segundo delineamento fatorial completo 2<sup>2</sup> com adição de pontos centrais

A produção de biossurfactantes com capacidade de formação de emulsões A/O foram superiores que as do primeiro planejamento experimental (Figura 2), sendo maiores que as daqueles com capacidade de formação de emulsões O/A.

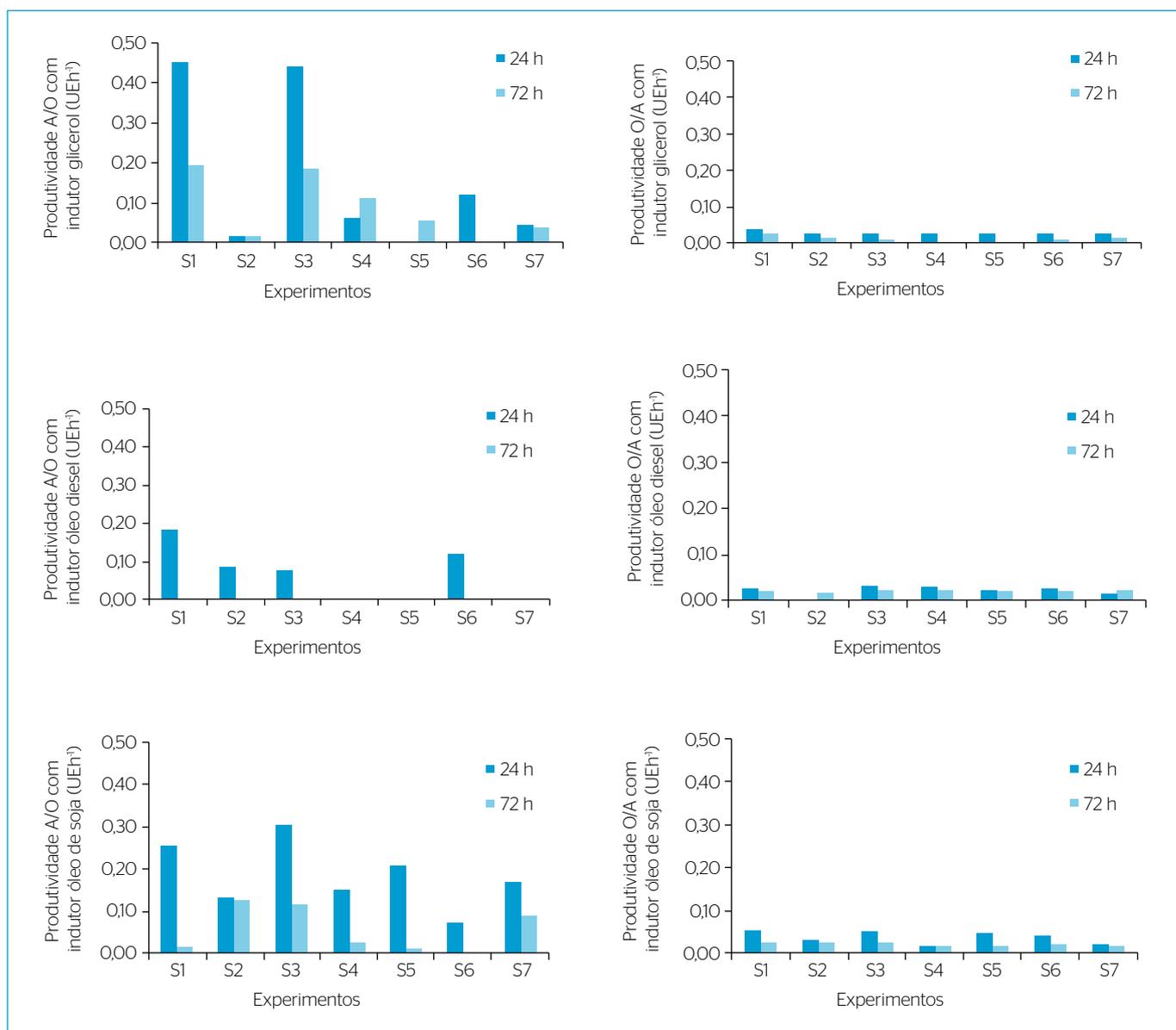


**Figura 1** - Produtividades de atividades emulsificantes água em óleo e óleo em água obtidas pelos biossurfactantes intra e extracelulares para os experimentos realizados com os indutores glicerol, óleo diesel e óleo de soja.

**Tabela 2** - Níveis de significância e efeitos estimados das variáveis sobre produtividade de emulsões água em óleo e atividade emulsificante óleo em água formadas a partir dos biossurfactantes extracelulares.

Atividade emulsificante	Níveis de significância (p)				Efeitos estimados (UE.h <sup>-1</sup> )		
	Fatores	Tipo de indutor			Tipo de indutor		
		Glicerol	Óleo diesel	Óleo de Soja	Glicerol	Óleo diesel	Óleo de Soja
A/O	x <sub>1</sub> [sac]	0,00002	0,00415	0,00000	-0,1200	-0,0437	-0,1784
	x <sub>2</sub> [ind]	0,21531	0,01393	0,00171	-0,0076	-0,0309	-0,0303
	x <sub>1</sub> ,x <sub>2</sub>	0,00074	0,01393	0,0053	0,0483	0,0309	0,0223
O/A	x <sub>1</sub> [sac]	0,20474	-	0,00120	0,0009	-	-0,0054
	x <sub>2</sub> [ind]	0,01037	-	0,07498	-0,0029	-	0,0015
	x <sub>1</sub> ,x <sub>2</sub>	0,00154	-	0,07498	-0,0050	-	-0,0015

A/O: água em óleo; O/A: óleo em água; sac: sacarose; ind: indutor.

**Figura 2** - Produtividades de atividades emulsificantes água em óleo e óleo em água obtidas pelos biossurfactantes extracelulares para os indutores glicerol, óleo diesel e óleo de soja.

Avaliando-se a produção de emulsões do tipo A/O nos experimentos com o indutor glicerol, houve produção de atividade emulsificante em 24 e 72 horas, com tempo de cultivo ideal de 24 horas. O experimento com maior produção de emulsões foi o S1 (2 g.L<sup>-1</sup> de sacarose e 15 g.L<sup>-1</sup> de indutor), com 0,45 UE.h<sup>-1</sup> em 24 horas. A produção de emulsões para o indutor óleo diesel foi observada somente em 24 horas de ensaio, sendo a maior produtividade verificada no experimento S1 (0,18 UE.h<sup>-1</sup>). Já para o óleo de soja, S3 (2 g.L<sup>-1</sup> de sacarose e 45 g.L<sup>-1</sup> de indutor) e S1 (2 g.L<sup>-1</sup> de sacarose e 15 g.L<sup>-1</sup> de indutor) foram os experimentos que apresentaram maiores produtividades de emulsões A/O, de 0,30 UE e 0,25 UE.h<sup>-1</sup>, respectivamente. As maiores produtividades ocorreram nos experimentos que continham a menor concentração de sacarose (S1 e S3). A atividade emulsificante aumenta, mas a velocidade de produção do emulsificante diminui. Por isso, os valores de produtividade, que levam em consideração o tempo de cultivo, são maiores no tempo de 24 horas. Isso pode estar associado à fase de crescimento do microrganismo, que cresce mais nas primeiras horas e depois entra em fase estacionária, afetando a produção de biossurfactantes.

Em relação à produção de biossurfactantes extracelulares capazes de estabilizar emulsões do tipo O/A, todos os experimentos apresentaram máximas produções em 24 horas de cultivo. Para o indutor glicerol, o experimento S1 (2 g.L<sup>-1</sup> de sacarose e 15 g.L<sup>-1</sup> de indutor) foi o que obteve maior produtividade em relação aos demais ensaios, de 0,03 UE.h<sup>-1</sup>. Quando utilizado óleo diesel, a maior produtividade verificada foi no experimento S3 (2 g.L<sup>-1</sup> de sacarose e 45 g.L<sup>-1</sup> de indutor), de 0,03 UE.h<sup>-1</sup>. Para o óleo de soja como indutor, a maior produtividade foi verificada para S1 (2 g.L<sup>-1</sup> de sacarose e 15 g.L<sup>-1</sup> de indutor) e S3 (2 g.L<sup>-1</sup> de sacarose e 45 g.L<sup>-1</sup> de indutor), com 0,05 UE.h<sup>-1</sup>. Os resultados indicam que os indutores óleo de soja e glicerol foram as fontes de carbono lipídicas que mais induziram a produção de biossurfactantes.

A Tabela 3 apresenta, para um nível de significância de 5%, os efeitos estimados das concentrações de sacarose e de indutor sobre

a produtividade de emulsões. Para as produtividades das emulsões A/O, essas concentrações apresentaram efeitos significativo e negativo ( $p < 0,05$ ) para todos os indutores testados, indicando que a adição de menores concentrações de sacarose e indutor óleo diesel no meio de cultivo favorecem a produção desses compostos. A concentração dos demais indutores não apresentou efeito significativo ( $p > 0,05$ ) sobre a produção de compostos com atividade emulsificante A/O.

Nas produções de atividades emulsificantes O/A, a adição de sacarose foi significativa e negativa para os três indutores testados, o que indica que sua redução é favorável à produtividade de emulsões O/A. Em relação à concentração dos indutores, o efeito foi significativo ( $p < 0,05$ ) sobre a produção de compostos para glicerol e óleo diesel, sendo o efeito negativo (-0,0052 UE.h<sup>-1</sup>) para o glicerol e positivo para o óleo diesel (+0,0181 UE.h<sup>-1</sup>). A interação dos efeitos da adição de sacarose e indutor foi significativa para o glicerol e o óleo diesel. Utilizando óleo diesel como indutor na maior concentração avaliada (45 g.L<sup>-1</sup>), as maiores concentrações de sacarose (10 e 6 g.L<sup>-1</sup>) não ocasionam efeito negativo sobre a produtividade de compostos. Ainda as maiores concentrações de indutor foram benéficas quando se utilizou óleo diesel, enquanto, para o glicerol, a maior produção de compostos se dá nas menores concentrações, tanto de indutor quanto de sacarose.

Lima e Alegre (2009) avaliaram a produção de biossurfactantes pela levedura *Saccharomyces lipolytica*, em um período de 72 horas, com adição de 50 g.L<sup>-1</sup> de óleo diesel como indutor, verificando valores de atividades emulsificantes de 0,01 UE.h<sup>-1</sup> em um pH 6,0. Os valores de nosso estudo assemelham-se aos obtidos. Para o tempo de 24 horas, para o experimento com 45 g.L<sup>-1</sup> de indutor (S3), obtivemos 0,08 UE.h<sup>-1</sup>, maior do que o estudo realizado e melhor em termos de produtividade, pois o tempo necessário para atingir a produção de emulsões nesta pesquisa foi menor.

Alcantara *et al.* (2012) estudaram a produção de biossurfactantes extracelulares de uma cepa isolada de *Saccharomyces cerevisiae* 2031

**Tabela 3 - Níveis de significância e efeitos estimados das variáveis sobre a produtividade de biossurfactantes para cada indutor testado.**

Atividade emulsificante	Fatores	Níveis de significância (p)			Efeitos estimados (UE.h <sup>-1</sup> )		
		Tipo de indutor			Tipo de indutor		
		Glicerol	Óleo diesel	Óleo de Soja	Glicerol	Óleo diesel	Óleo de Soja
A/O	x <sub>1</sub> [sac]	0,00001	0,04003	0,03172	-0,4065	-0,0861	-0,1361
	x <sub>2</sub> [ind]	0,60973	0,02674	0,54270	0,0180	-0,0950	0,0339
	x <sub>1</sub> x <sub>2</sub>	0,42647	0,77750	0,80471	0,0284	0,1055	-0,0136
	Curvatura	0,00005	0,13064	0,16665	-0,3716	-0,0912	-0,1232
O/A	x <sub>1</sub> [sac]	0,00667	0,00372	0,00271	-0,0037	-0,0137	-0,0275
	x <sub>2</sub> [ind]	0,00089	0,00063	0,24394	-0,0052	0,0181	-0,0083
	x <sub>1</sub> x <sub>2</sub>	0,00013	0,0078	0,44390	0,0068	0,0120	-0,0053
	Curvatura	0,06838	0,52028	0,60067	-0,0033	-0,0036	-0,0055

A/O: água em óleo; O/A: óleo em água; sac: sacarose; ind: indutor.

com adições combinadas de 80 g.L<sup>-1</sup> de glicose e 50 g.L<sup>-1</sup> de óleo de cozinha, obtendo a maior atividade emulsificante (0,65 UE.h<sup>-1</sup>) em 96 horas de produção. Essa produção, superior à obtida em nosso estudo, pode ser justificada pela alta concentração de glicose adicionada, fonte de carbono de estrutura química mais simples que a sacarose.

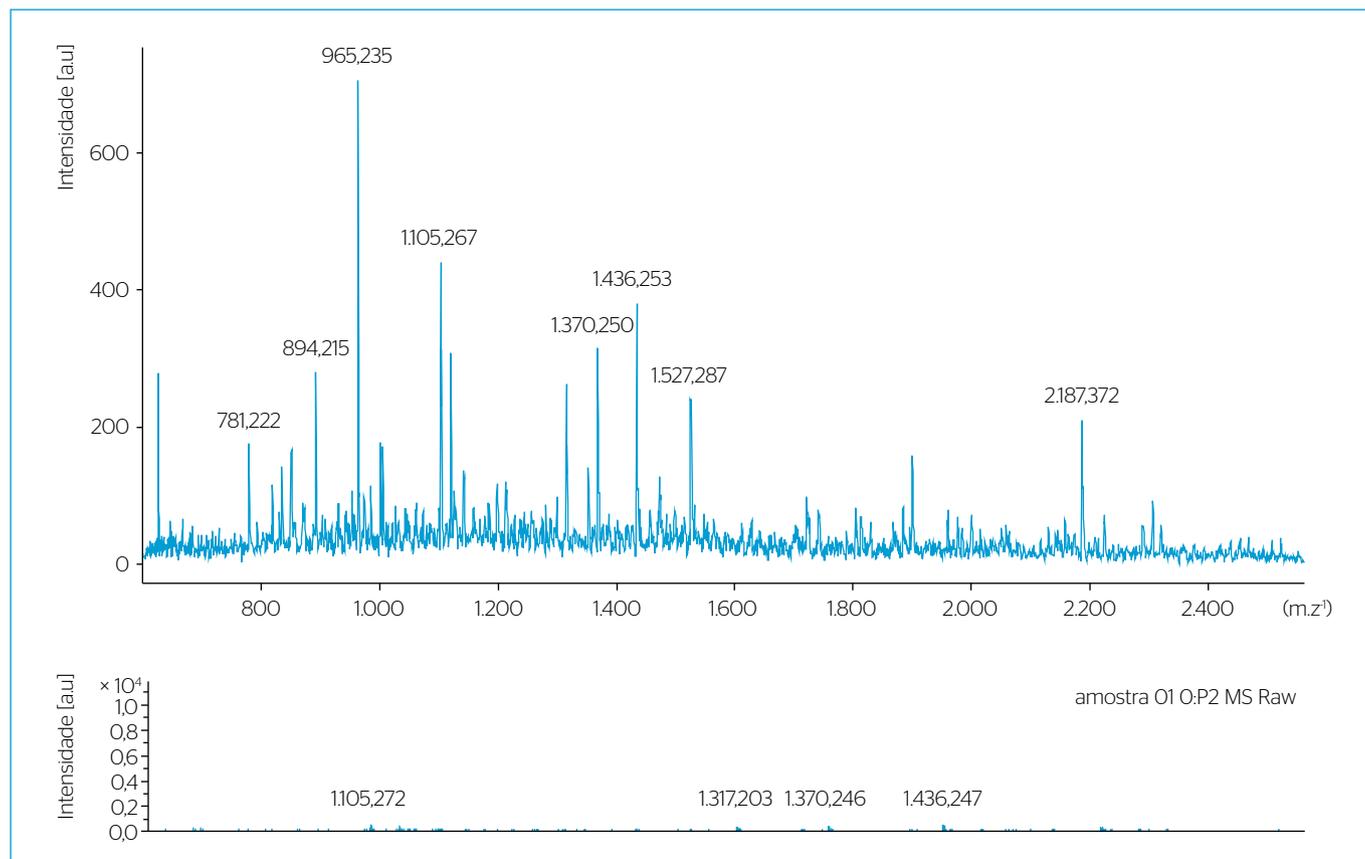
A Tabela 4 apresenta os resultados da redução da tensão superficial avaliada para os tempos 24 e 72 horas. Para o indutor glicerol, houve redução somente em 72 horas de cultivo, e a maior redução foi para o

experimento S7 (6 g.L<sup>-1</sup> de sacarose e 30 g.L<sup>-1</sup> de indutor), com 6,99%, de 48,08 ± 0,16 mN.m<sup>-1</sup> para 44,71 ± 0,06 mN.m<sup>-1</sup>. Quando utilizado óleo diesel como indutor, no experimento S2 (10 g.L<sup>-1</sup> de sacarose e 15 g.L<sup>-1</sup> de indutor), em 72 horas, foi verificado o maior percentual de redução de todo o ensaio, de 9,89% (de 30,53 ± 0,33 mN.m<sup>-1</sup> para 27,51 ± 0,05 mN.m<sup>-1</sup>). Com o indutor óleo de soja, o percentual de redução atingido foi verificado em 24 horas, para o experimento S5 (6 g.L<sup>-1</sup> de sacarose e 30 g.L<sup>-1</sup> de indutor), no qual houve redução de tensão superficial de 34,41 ± 0,17 mN.m<sup>-1</sup> para 31,91 ± 0,05 mN.m<sup>-1</sup>.

**Tabela 4** - Redução percentual da tensão superficial (%) para os três indutores testados em 24 e 72 horas de bioprocesso.

Experimento	Glicerol		Óleo diesel		Óleo de soja	
	Redução em 24 horas	Redução em 72 horas	Redução em 24 horas	Redução em 72 horas	Redução em 24 horas	Redução em 72 horas
S1	ND	0,40%	ND	ND	5,01%	ND
S2	ND	ND	ND	9,89%	5,41%	ND
S3	ND	5,15%	5,23%	ND	3,72%	ND
S4	ND	ND	ND	4,42%	ND	0,96%
S5	ND	6,87%	3,79%	4,43%	7,27%	ND
S6	ND	ND	ND	6,25%	3,84%	ND
S7	ND	6,99%	0,03%	ND	ND	0,40%

ND: não detectada redução de tensão superficial.



**Figura 3** - Espectro de *matrix-assisted laser desorption/ionization-mass spectrometry* de biossurfactante produzido por *Saccharomyces cerevisiae*, com a detecção dos íons que caracterizam as isoformas de sofrorolípídios e com ampliação da região de m.z<sup>1</sup> 1.000 a 1.140.

A redução da tensão superficial indica a produção de agentes tensoativos no bioprocesso. Os indutores óleo diesel e óleo de soja mostram efetiva capacidade para redução da tensão superficial devido à característica hidrofóbica de ambos. A combinação entre carbonos insolúvel e solúvel torna-se ideal para síntese das frações hidrofílicas e hidrofóbicas das moléculas que foram o biossurfactante (SATPUTE *et al.*, 2010). Atingiram-se valores inferiores a  $35 \text{ mN.m}^{-1}$ , o que, de acordo com Cooper e Paddock (1984), indica a eficiência do biossurfactante produzido. Entretanto, ressalta-se que o biossurfactante polimérico produzido pela levedura *S. cerevisiae*, por possuir alto peso molecular, tem sua estrutura micelar comprometida. Segundo Uzoigwe *et al.* (2015) e Colla e Costa (2003), a formação de micelas é impossibilitada pelo rearranjo molecular do meio, o que influencia nas ligações e interações hidrofóbicas e hidrofílicas, limitando o emulsificante de reduzir tensão superficial de meios.

Accorsini *et al.* (2012) avaliaram a produção de biossurfactantes por *Candida antarctica*, cultivada durante um período de sete dias, utilizando glicerol como substrato. Esses autores verificaram redução da tensão superficial de 43% dos meios nas primeiras 24 horas de incubação (sendo a tensão inicial de  $47 \text{ mN.m}^{-1}$  reduzida para  $32 \text{ mN.m}^{-1}$ ). A diminuição de tensão superficial em nosso estudo foi de até 6,99% em 72 horas, indicando ainda baixa capacidade de redução de tensão superficial pela levedura *Saccharomyces cerevisiae*.

A análise da espectrometria de massa foi realizada para o biossurfactante produzido com o indutor glicerol, com o experimento de maior atividade emulsificante A/O verificado (experimento S1). O espectro foi obtido com o uso de MALDI-MS e indica um perfil caracterizado pelos íons com picos de valores de  $m/z$  781, 894, 965, 1.105, 1.370, 1.436, 1.527 e 2.187 (Figura 3), que representam as famílias de biossurfactantes extracelulares produzidos por *S. cerevisiae* como soforolipídios.

Os soforolipídios caracterizam-se por serem glicolipídios extracelulares que possuem uma cauda lipídica e uma cabeça formada por

um carboidrato. O espectro encontrado assemelha-se ao produzido por cinco espécies de leveduras — *Starmerella bombicola* NRRL Y-17069, *Candida stellata* NRRL Y-1446, *Candida sp.* NRRL Y-27208, *Candida riidocensis* NRRL Y-27859 e *Candida apicola* NRRL Y-2481 —, caracterizadas por Price *et al.* (2012) como soforolipídios e pertencentes à classe dos glicolipídios. Joshi-Navare, Khanvilkar e Prabhune (2013) também identificaram soforolipídios semelhantes aos resultados obtidos para a levedura da *C. bombicola* (ATCC22214).

A produção de biossurfactantes extracelulares pertencentes à subclasse dos soforolipídios pela levedura *S. cerevisiae* e de biossurfactantes intracelulares de manoproteínas mostra que a levedura é capaz de produzir ambos os tipos de biossurfactantes. Esse novo indicativo confirma o alto potencial, ainda não totalmente explorado, da aplicação desse biossurfactante em diversas áreas, com destaque para a área ambiental, em que pode ser aplicado em processos de biorremediação de contaminantes oleosos como uma alternativa de baixo custo se comparado a outros processos de tratamento de contaminantes (MARCHANT; BANAT, 2012; MINUCELLI, 2015).

## CONCLUSÕES

A produção de biossurfactantes intracelulares por *S. cerevisiae* é superior à de extracelulares. As atividades emulsificantes A/O são superiores às O/A. Entre os indutores testados, os que apresentaram melhor atividade emulsificante e maior produção de biossurfactantes foi o glicerol, seguido pelo óleo de soja. A levedura *Saccharomyces cerevisiae* possui significativo crescimento celular em meios contendo concentrações baixas de sacarose e altas de indutor. A redução da tensão superficial ainda é baixa para as condições experimentais estudadas. A otimização realizada nos experimentos comprovou aumento de produtividade de biossurfactantes.

## REFERÊNCIAS

- ACCORSINI, F.R.; MUTTON, M.J.R.; LEMOS, E.G.M.; BENINCASA, M. (2012) Biosurfactant production by yeasts using soybean oil and glycerol as low cost substrate. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 43, n. 1, p. 116-25. <http://dx.doi.org/10.1590/S1517-83822012000100013>
- ALCANTARA, V.A.; PAJARES, I.G.; SIMBAHAN, J.F.; RUBIO, M.L.D. (2012) Substrate dependent production and isolation of an extracellular biosurfactant from *Saccharomyces cerevisiae* 2031. *The Philippine Journal of Science*, v. 141, n. 1, p. 13-24.
- ARAUJO, L.V.; FREIRE, D.M.G.; NITSCHKE, M. (2013) Biossurfactantes: propriedades anticorrosivas, antibiofilmes e antimicrobianas. *Química Nova*, v. 36, n. 6, p. 848-58. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422013000600019>
- BANAT, I.M.; SATPUTE, S.K.; CAMEOTRA, S.S.; PATIL, R.; NYAYANIT, N.V. (2014) Cost effective technologies and renewable substrates for biosurfactants' production. *Frontiers in Microbiology*, v. 5, p. 697. <https://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2014.00697>
- BARRIGA, J.A.T.; COOPER, D.G.; IDZIAK, E.S.; CAMERON, D.R. (1999) Components of the bioemulsifier from *S. cerevisiae*. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 25, n. 1, p. 96-102.
- BARROS, F.F.C.; QUADROS, C.P.; MARÓSTICA JÚNIOR, M. R.; PASTORE, G.M. (2007) Surfactina: propriedades químicas, tecnológicas e funcionais para aplicações em alimentos. *Química Nova*, v. 30, n. 2, p. 409-414. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422007000200031>

- BEZZA, F.A.; CHIRWA, E.M.N. (2015) Production and applications of lipopeptide biosurfactant for bioremediation and oil recovery by *Bacillus subtilis* CN2. *Biochemical Engineering Journal*, v. 101, p. 168-178. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bej.2015.05.007>
- CAMERON, D.R.; COOPER, D.G.; NEUFELD, R.J. (1988) The mannoprotein of *Saccharomyces cerevisiae* is an effective bioemulsifier. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 54, n. 6, p. 1420-1425.
- CHAPRÃO, M.J.; FERREIRA, I.N.S.; CORREA, P.F.; RUFINO, R.D.; LUNA, J.M.; SILVA, E.J.; SARUBBO, L.A. (2015) Application of bacterial and yeast biosurfactants for enhanced removal and biodegradation of motor oil from contaminated sand. *Electronic Journal of Biotechnology*, v. 18, n. 6, p. 471-479. <https://doi.org/10.1016/j.ejbt.2015.09.005>
- COLLA, L.M.; COSTA, J.A.V. (2003) Obtenção e aplicação de biossurfactantes. *Vetor*, v. 13, p. 85-103.
- COOPER, D.G.; PADDOCK, D.A. (1984) Production of a biosurfactant from *Torulopsis bombicola*. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 47, n. 1, p. 173-176.
- COSTA, A.G.; MAGNANI, M.; CASTRO-GOMÉZ, R.J.H. (2012) Obtenção e caracterização de manoproteínas da parede celular de leveduras de descarte em cervejaria. *Acta Scientiarum Biological Sciences*, v. 34, n. 1, p. 77-84. <http://doi.org/10.4025/actascibiolsci.v34i1.7124>
- DECESARO, A.; BERTICELLI, R.; MAGRO, F.G.; COLLA, L.M. (2015) Biossurfactantes em Processos de Biorremediação. *Revista Ciências Exatas e Naturais*, v. 17, n. 1, p. 119-143.
- DECESARO, A.; RIGON, M.R.; THOMÉ, A.; COLLA, L.M. (2013) Produção de biossurfactantes por microrganismos isolados de solo contaminado com óleo diesel. *Química Nova*, v. 36, n. 7, p. 947-954. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422013000700005>
- DESAI, J.D.; BANAT, I.M. (1997) Microbial production of surfactants and their commercial potential. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, v. 61, n. 1, p. 47-64.
- DIKIT, P.; MANEERAT, S.; MUSIKASANG, H.; H-KITTIKUN, A. (2010) Emulsifier properties of the mannoprotein extract from yeast isolated from sugar palm wine. *Science Asia*, v. 36, n. 4, p. 312-318. <http://dx.doi.org/10.2306/scienceasia1513-1874.2010.36.312>
- FAl, A.E.C.; SIMIQUELI, A.P.R.; ANDRADE, C.J.; GHISELLI, G.; PASTORE, G.M. (2015) Optimized production of biosurfactant from *Pseudozyma tsukubaensis* using cassava wastewater and consecutive production of galactooligosaccharides: An integrated process. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, v. 4, n. 4, p. 535-542. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2015.10.001>
- FONTES, G.C.; AMARAL, P.F.F.; COELHO, M.A.Z. (2008) Produção de biossurfactantes por levedura. *Química Nova*, v. 31, n. 8, p. 2091-2099. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40420080008000033>
- GHARAEI-FATHABAD, E. (2011) Biosurfactants in pharmaceutical industry: a mini-review. *American Journal of Drug Discovery and Development*, v. 1, n. 1, p. 58-69. <http://dx.doi.org/10.3923/ajdd.2011.58.69>
- ILORI, M.O.; ADEBUSOYE, S.A.; OJO, A.C. (2008) Isolation and characterization of hydrocarbon-degrading and biosurfactant-producing yeast strains obtained from a polluted lagoon water. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 24, n. 11, p. 2539-2545. <http://dx.doi.org/10.1007/s11274-008-9778-3>
- ILORI, M.O.; AMOBI, C.J.; ODOCHA, A.C. (2005) Factors affecting biosurfactant production by oil degrading *Aeromonas* spp. isolated from a tropical environment. *Chemosphere*, v. 61, n. 7, p. 985-992. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2005.03.066>
- JAIN, R.M.; MODY, K.; JOSHI, N.; MISHRA, A.; JHA, B. (2013) Effect of unconventional carbon sources on biosurfactant production and its application in bioremediation. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 62, p. 52-58. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2013.08.030>
- JOSHI-NAVARE, K.; KHANVILKAR, P.; PRABHUNE, A. (2013) Jatropha oil derived sophorolipids: production and characterization as laundry detergent additive. *Biochemistry Research International*, v. 2013, p. 1-12. <http://dx.doi.org/10.1155/2013/169797>
- KATEMAI, W. (2011) Biosurfactants from yeasts. *Walailak Journal of Science and Technology*, v. 9, n. 1, p. 1-8. <http://dx.doi.org/10.2004/wjst.v9i1.24>
- LIMA, A.S.; ALEGRE, R.M. (2009) Evaluation of emulsifier stability of biosurfactant produced by *Saccharomyces lipolytica* CCT-0913. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, v. 52, n. 2, p. 285-290. <http://dx.doi.org/10.1590/S1516-89132009000200004>
- LIU, X.Y.; WANG, Q.; CUI, S.W.; LIU, H.Z. (2008) A new isolation method of  $\beta$ -D-glucans from spent yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Hydrocolloids*, v. 22, n. 2, p. 239-247. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodhyd.2006.11.008>
- LUNA, J.M.; RUFINO, R.D.; JARA, A.M.A.T.; BRASILEIRO, P.P.F.; SARUBBO, L.A. (2015) Environmental applications of the biosurfactant produced by *Candida sphaerica* cultivated in low-cost substrates. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, v. 480, p. 413-418. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2014.12.014>
- MAKKAR, R.S.; ROCKNE, K.J. (2003) Comparison of synthetic surfactants and biosurfactants in enhancing biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Environmental Toxicology and Chemistry*, v. 22, n. 10, p. 2280-2292. <https://doi.org/10.1897/02-472>
- MARCHANT, R.; BANAT, I.M. (2012) Microbial biosurfactants: challenges and opportunities for future exploitation. *Trends in Biotechnology*, v. 30, n. 11, p. 558-565. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2012.07.003>
- MARTINS, V.G.; KALIL, S.J.; ELIT, T.E.; COSTA, J.A.V. (2006) Solid State Biosurfactant Production in a Fixed-Bed Column Bioreactor. *Zeitschrift für Naturforschung*, v. 61, n. 9-10, p. 721-726. <https://doi.org/10.1515/znc-2006-9-1019>
- MELO, A.N.F.; SOUZA, E.L.; ARAUJO, V.B.S.; MAGNANI, M. (2015) Stability, nutritional and sensory characteristics of French salad dressing made with mannoprotein from spent brewer's yeast. *LWT-Food Science and Technology*, v. 62, n. 1, p. 771-774. <http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2014.06.050>

MINUCELI, T. (2015) *Produção de sofrorolipídios de Candida bombicola ATCC 22214 em substratos industriais de baixo custo e aplicação em biorremediação*. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina.

MORAIS, R.K.S.; ABUD, A.K.S. (2012) Utilização de biossurfactantes produzidos a partir de resíduos agroindustriais na biorremediação do petróleo. *Scientia Plena*, v. 8, n. 10, p. 1-7.

PACWA-PLOCINICZAK, M.; PLAZA, G.A.; PIOTROWSKA-SEGET, Z.; CAMEOTRA, S.S. (2011) Environmental applications of Biosurfactants: Recent advances. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 12, n. 1, p.633-654. <https://doi.org/10.3390/ijms12010633>

PRICE, N.P.J.; RAY, K.J.; VERMILION, K.E.; DUNLAP, C.A.; KURTZMAN, C.P. (2012) Structural characterization of novel sophorolipid biosurfactants from a newly identified species of *Candida* yeast. *Carbohydrate Research*, v. 348, p. 33-41. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2011.07.016>

SANTOS, D.K.F.; BRANDÃO, Y.B.; RUFINO, R.D.; LUNA, J.M.; SALGUEIRO, A.A.; SANTOS, V.A.; SARUBBO, L.A. (2014) Optimization of cultural conditions for biosurfactant production from *Candida lipolytica*. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, v. 3, n. 3, p. 48-57. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2014.02.004>

SARI, M.; KUSHARYOTO, W.; ARTIKA, I.M. (2014) Screening for biosurfactant-producing yeast: confirmation of biosurfactant production. *Biotechnology*, v. 13, n. 3, p. 106-111. <https://doi.org/10.3923/biotech.2014.106.111>

SATPUTE, S.K.; BANPURKAR, A.G.; DHAKEPHALKAR, P.K.; BANAT, I.M.; CHOPADE, B.A. (2010) Methods for investigating biosurfactants and bioemulsifiers: a review. *Critical Reviews in Biotechnology*, v. 30, n. 2, p. 127-144. <https://doi.org/10.3109/07388550903427280>

TORABIZADEH, H.; SHOJAOSADATI, S.A.; TEHRANI, H.A. (1996) Preparation and characterisation of bioemulsifier from *Saccharomyces cerevisiae* and its application in food products. *LWT-Food Science and Technology*, v. 29, n. 8, p. 734-737.

UZOIGWE, C.; BURGESS, J.G.; ENNIS, C.J.; RAHMAN, P.K.S.M. (2015) Bioemulsifiers are not biosurfactants and require different screening approaches. *Frontiers in Microbiology*, v. 6, p. 245. <https://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2015.00245>

VILELA, E.S.D.; SGARBIERI, V.C.; ALVIM, I.D. (2000) Determinação do valor proteico de células íntegras, autolisado total e extrato de levedura (*Saccharomyces* sp.). *Revista Nutrição*, v. 13, n. 3, p. 185-192. <http://dx.doi.org/10.1590/S1415-52732000000300005>

WU, J.; GUAN, Y.; ZHONG, Q. (2015) Yeast mannoproteins improve thermal stability of anthocyanins at pH 7.0. *Food Chemistry*, v. 172, p. 121-128. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.09.059>